

# 胎生および新生マウス腎臓における細胞死の組織学的観察

## —特に皮質ネフロン形成細胞の分化との関連—

進藤 彰久

腎臓の発達時に出現する細胞死について、ネフロン形成との関連を明らかにすることを目的として、胎生後期から出生直後のマウス腎臓を光学顕微鏡で観察した。胎生18日、生後0日および生後2日で摘出した腎臓から1  $\mu$ m厚の水溶性樹脂準超薄連続切片を作成し、また一部はパラフィン切片を作り TUNEL 法で観察した。胎生18日～生後2日の腎臓皮質と髄質には多数の核分裂像にまじって、核が濃縮・凝集して断片化する細胞が出現する。死細胞の単位面積当たりの数は出生後増加する傾向があり、とくに髄質で胎生18日から生後2日の間に約3倍に増加する。細胞死はネフロン形成細胞群と間質細胞群のどちらにも出現し、皮質では被膜の直下に、髄質では腎乳頭の先端部付近に多く認められる。この死に至る細胞は TUNEL 法で陽性であり、アポトーシスの過程で死に至ると判定される。

皮質におけるネフロンの形成過程は、はじめ2分枝した尿管芽の先端部付近に間葉細胞が集まって造腎帽子となり、次いでカンマ型腎胞、そしてS字型腎胞へと発達する。S字型腎胞期に毛細血管が腎胞内に進入し、腎胞先端部の細胞から糸球体包が形成される。皮質ネフロン構成細胞群における細胞死は、とくにS字型腎胞期で多く認められ、腎胞先端部の部位に局在して、尿細管に分化する前駆細胞中には少ない。細胞死はS字型腎胞期から未熟な腎小体中に出現する。プログラム細胞死と皮質におけるネフロン形成細胞の分化との関連を考察した。

(平成10年4月30日受理)

## Histological Observations on Cell Death in the Developing Kidneys of the Fetal and Newborn Mice, with Special Reference to Differentiation of Nephron-forming Cells in the Renal Cortex

Akihisa SHINDO

Cell death occurring in developing kidneys was examined light microscopically in 30 ICR-mice. The kidneys were removed at 18 days of gestation, 0 and 2 days after birth, fixed in Karnowsky's fluid and embedded in glycolmecacrylate mixture for 1  $\mu$ m semithin sections. Distribution of apoptotic cells was also examined by the TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end-labeling) method in paraffin section. Between 18 days of gestation and 2 days after birth, the kidneys contained not only numerous mitotic figures but also dying cells with pyknotic and fragmented nuclei. After birth, number of dying cells per unit area slightly increased, and its 3-fold increase was observed in the medulla. Dying cells could be recognized in both nephron-forming cell clusters and mesenchymal cell clusters, and numerous dying cells could be

detected in the outer cortex beneath the capsule and the medullary papilla. Since clearcut positive staining appeared in the TUNEL assay, the cell death was shown to be through apoptosis.

In the process of nephron development in the cortex, metanephric cap, i.e. the cell mass of mesoderm, was first formed around the tips of the two branches of ureteric ducts, then the cell mass became comma-shaped. As the glomerular apparatus of the nephron took shape, a slit formed in the comma-shaped metanephric vesicle, transforming it into an S-shaped structure, and the metanephric vesicles were invaded by capillaries through the slit. The apoptotic cells in the nephron-forming cell clusters appeared at an S-shaped metanephric vesicle stage and were localized in the cell layer of future glomerular capsules. The relationship between programmed cell death and nephron-forming cell differentiation in the renal cortex was discussed. (Accepted on April 30, 1998) *Kawasaki*

*Igakkaishi 24(1): 7-15, 1998*

**Key Words** ① Kidney ② Apoptosis ③ Development  
④ TUNEL assay ⑤ Mouse

## はじめに

近年、細胞の死に関連して、外部からの影響によって細胞が死に至る‘壊死-ネクロシス’に対して、細胞自らが死へのプロセスへと進む‘アポトーシス’という概念が提唱され<sup>1),2)</sup>、個体発生時の器官形成に伴う大量の細胞死すなわち‘プログラム細胞死’もアポトーシスによる細胞死としてとらえられるようになってきた<sup>3)</sup>。腎臓は尿を産生・分泌する器官として、糸球体、糸球体包、尿細管、集合管などきわめて複雑に分化した細胞・組織構成を持ち、その器官形成に関連して腎臓原基に大量のアポトーシスが発生することが明らかにされている<sup>4)</sup>。特に間葉細胞からネフロン形成細胞群が分化する際にアポトーシスが重要な役割を果たすといわれているが<sup>5),6)</sup>、腎臓におけるアポトーシスをネフロンの分化・発達・形態形成過程と関連させて検討した報告は少ない。本研究の目的は、ネフロンの形成が顕著な胎生後期と生後早期のマウス腎臓を用い、細胞死の発生と局在を腎臓皮髄両質にわたって広く観察して、腎臓発生時におけるプログラム細胞死の意義を、特に皮質のネフロンの形態形成と関連して組織学的に明らかにすることである。

## 材料と方法

使用した動物は胎生18日の胎子10例、生後0日と生後2日の新生マウス各々10例の総計30例である。マウスは恒常的条件下(22±2℃)で固形飼料(オリエンタル酵母工業, NMF)と自由飲水とで飼育した。雌性成熟マウスを一晩雄性マウスと交配し、翌朝を妊娠0日とした。妊娠18日目でクロロホルムにて深麻酔後に開腹し、子宮より胎子を摘出した。新生マウスは生後0日と生後2日で断頭した。胎子および新生マウスから両側の腎臓を摘出し、次の方法で準超薄切片を作成して光顕観察した。また一部の腎臓からパラフィン切片を作成し、TUNEL法でDNAの断片化を検出した。

### 準超薄切片標本

摘出した腎臓はただちにカルノフスキー液すなわち4%パラホルムアルデヒドと5%グルタルアルアルデヒドの混合液(0.1M カコジレート緩衝液, pH7.4)に投入し、4時間固定した。固定後アルコール系列で脱水し、水溶性樹脂(テクノビット7100, Kulzer社製)に包埋した。ガラスナイフをもちいて、腎臓前額面で1μm厚の準超薄連続切片を作製して、トルイジンブルーで染色し光顕にて観察した。

腎臓皮質と髄質の単位面積当たりの死細胞数:

胎生18日、生後0日及び生後2日各5例の腎臓正中部位切片で、被膜から腎乳頭を含む準超薄切片で算出した。腎臓切片全体の低倍率顕微鏡写真を撮影し、36倍に拡大した後、腎臓の輪郭および皮髄境界領域の輪郭を透明プラスチックシートにトレースし、皮質および髄質の断面積を求めた。ついで、切片を油浸レンズ下で観察し、濃縮核や断片核を有する細胞をプラスチックシート上にマーク・カウントし、死細胞数と皮髄両質の面積から単位面積あたり ( $/\text{mm}^2$ ) の死細胞数を算出した。この時、死細胞の局在をネフロン・集合管前駆細胞集団の実質細胞群と間葉・結合組織の間質細胞群の2群に区別して算出した。各年齢の平均値はStudentのTテストで有意差を検定した。

S字型腎胞における細胞死の局在分布：生後2日のマウス腎臓の準超薄連続切片のうち、1個のS字型腎胞を含有する18枚の連続切片を選び、S字型腎胞の連続顕微鏡写真を撮影し、100倍に拡大して腎胞の輪郭をプラスチックシートにトレースした。同腎胞の連続切片に含まれる死細胞を油浸レンズで観察マークし、S字型腎胞内の細胞死の局在分布を観察した。

#### プログラム細胞死の検出

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end-labeling) 法<sup>7)</sup> でプログラム細胞死を検出した。すなわち、生後2日のマウス腎臓を摘出後、ただちに4%パラホルムアルデヒド液 (リン酸緩衝生理食塩水-PBS, pH 7.4) で4℃にて12時間固定し、アルコール系列で脱水した後パラフィンに包埋し、ミクロトームで3  $\mu\text{m}$  切片を作成した。脱パラフィンした後、PBSで洗浄し、室温で30分間0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (99%メタノール) に浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを封鎖した。蒸留水で洗浄後、再度PBSで洗浄し、TUNEL反応液 (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Cat. No. 1684817, Boehringer Mannheim 社製) で60分間37℃で反応させた。次に、再びPBSで洗浄した後、コンバーターPOD液 (ペルオキシダーゼ標識羊由来抗フルオレセイン抗体, Fabフラ

グメント) を30分間37℃で反応させた。PBS洗浄後、DAB (3, 3'-ジアミノベンチジン 20 mg, 0.05 M Tris-HCl pH7.6 100 ml, 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1 ml) で2分間発色させ、光顕観察した。対照標本はTUNEL反応液のかわりにターミナルトランスフェラーゼを含まない標識液で処理した。

なお、本研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認 (No. 96-120) を受け、川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施した。

## 成 績

### 1. 胎生後期ならびに新生子期の腎臓皮髄両質におけるネフロン形成

マウスの腎臓は単一の腎葉から成り、腎葉は外側の皮質と内側の髄質から構成される (Fig.

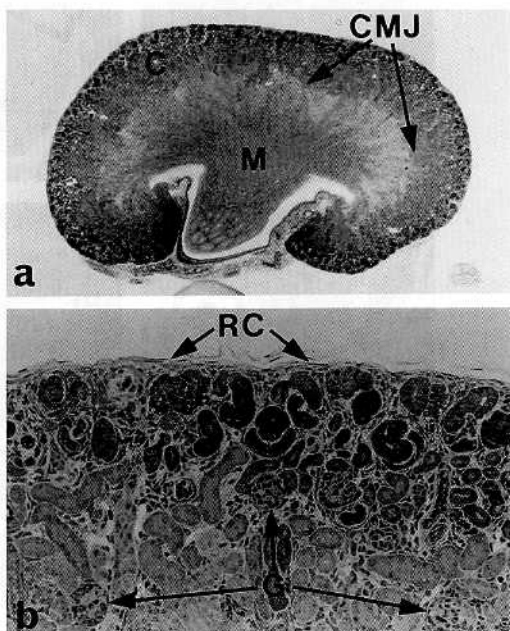


Fig. 1. Mouse kidney. Two days after birth. Toluidine blue staining.

- a. A low-powered micrograph,  $\times 16$ . C : cortex, M : medulla, CMJ : cortico-medullary junction.  
b. Renal cortex. The outer cortex beneath the renal capsule (RC) contains numerous immature metanephric vesicles, and well developed glomeruli (G) can be observed in the deep cortex near the cortico-medullary junction.  $\times 100$ .

1a). 胎生18日から生後2日のマウス腎臓では、皮質は髓質の外側に薄い層状に分布し、生後急速にその厚さを増す。出生前後の腎実質では皮髓両質共に疎な間葉組織の中にネフロン形成途上の細胞集団が多数観察され (Fig. 1b), 生後もネフロン形成が進行する。皮質では腎小体の形成が進行し、被膜直下には尿管芽の周囲に集合する帽子状間葉細胞群すなわち造腎帽子 (Fig. 2a) や、コンマ型腎胞 (Fig. 2b), さらにその深層にはS字型腎胞 (Fig. 2c), さらに皮質の最深層には完成途上の腎小体 (Fig. 2d,e)

がみられ、ネフロン形成の各段階が被膜直下から皮髓境界領域に向かって連続的に層をなして観察される。すなわち皮質深層で皮髓境界領域に近い腎小体が最も早期に形成され、被膜に近いほど未熟な腎小体が配列する。ネフロン先端部の細胞集団が腎小体へと分化する途上で、毛細血管が周囲の間葉組織よりネフロン形成細胞集団内に侵入し、後にこの毛細血管が糸球体毛細血管ループへと発達する。腎胞への毛細血管の侵入はS字型腎胞期から始まり (Fig. 2c), 毛細血管は周囲に少量の間葉組織を伴ってネフ

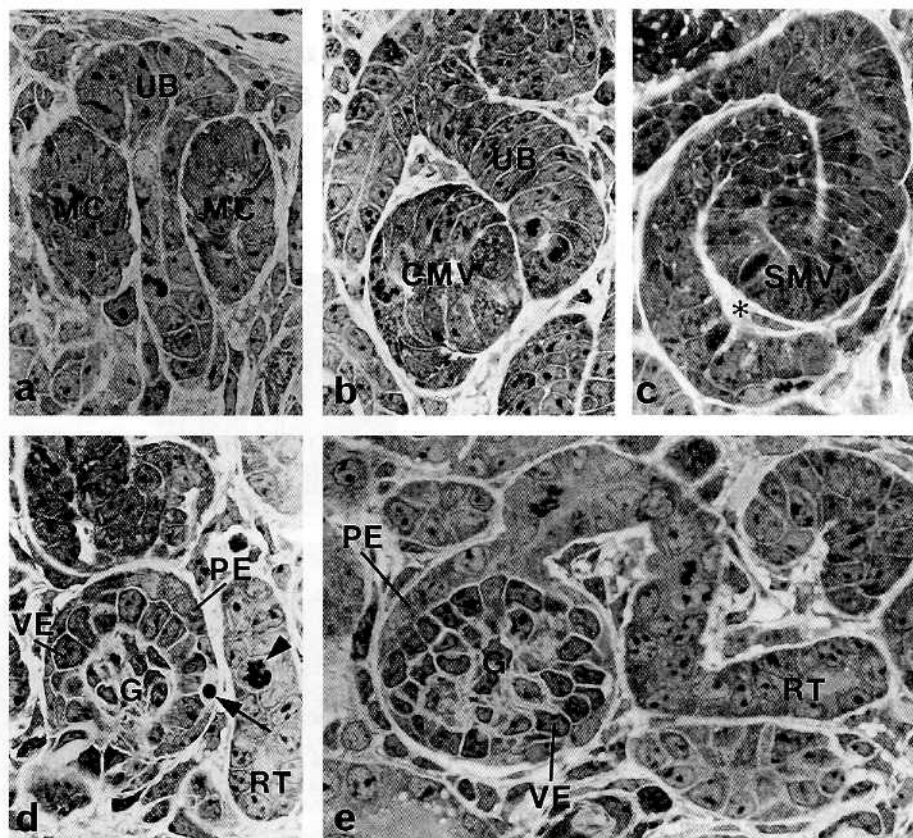


Fig. 2. Nephrons at various developmental stages in the cortex. Two days after birth. Toluidine blue staining,  $\times 660$ . UB: ureteric bud.

a. Metanephric cap (MC) stage.

b. Comma-shaped metanephric vesicle (CMV).

c. S-shaped metanephric vesicle (SMV). The asterisk indicates a slit for capillary invasion.

d. Developing renal corpuscle. The visceral epithelium (VE) and parietal epithelium (PE) of Bowman's capsule surround an immature glomerulus (G). A pyknotic nucleus (arrow) can be seen in Bowman's capsule, and a renal tubule (RT) contains a mitotic figure (arrowhead).

e. An immature renal corpuscle in the deep cortex. G: glomerulus, PE: parietal epithelium, RT: renal tubule, VE: visceral epithelium.



ロン形成細胞集団内へと侵入する。この時、毛細血管の侵入部を境として、それより先端で腎小体へと分化する細胞群すなわち糸球体包上皮前駆細胞群と毛細血管侵入部より後方の尿細管へ分化する細胞群すなわち尿細管前駆細胞群との2部を区別できる。尿細管前駆細胞群は一樣に高さ9~11  $\mu\text{m}$ の円柱細胞であるが、糸球体包上皮前駆細胞群は立方形から一部扁平となり、形態的にも2部の間で形態の分化が生じる。さらに糸球体包上皮前駆細胞群は2層の細胞から成る。すなわち、侵入した毛細血管と直に隣接し血管を取り囲みつつ足細胞へと分化する足細胞前駆細胞層と、腎胞最先端の糸球体包外壁前駆細胞層である (Fig. 2d)。足細胞前駆細胞は円柱状から立方状へと形態をかえ、高さ3~5  $\mu\text{m}$ の立方上皮となり、一方、糸球体包外壁前駆細胞はその厚さが1.5  $\mu\text{m}$ となり著しく扁平化する。S字型腎胞期以後、足細胞前駆細胞は毛細血管のループ形成が進むとともに血管と密接して移動し、外壁前駆細胞群と解離して、外壁前駆細胞層と足細胞前駆細胞層の間に包内腔が形成されるようになる (Fig. 2e)。皮質における腎小体の発達を Figure 3 に模式的に示した。

腎髄質は胎生18日において弓状動脈から腎乳頭へとむかう明調な扇状の領域で、縦走する集合管の他に尿細管の断面が含まれるがその数は少なく、隣接する尿細管・集合管の間は豊富な間葉組織で占められるのが特徴である (Fig.

4a)。出生以後に腎乳頭は腎門部から突出するようになり、それとともに髄質内には尿細管が増加して、間葉組織は相対的に減少する。生後2日の腎臓では間葉組織は皮髄境界領域にわずかに残るのみとなる (Fig. 4b)。

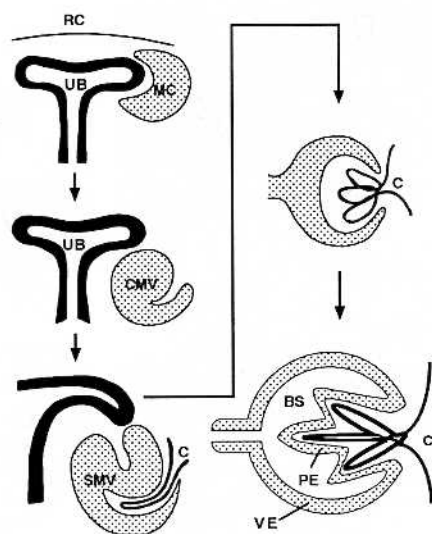


Fig. 3. A schematic diagram showing nephron formation in the renal cortex.

In the process of nephron development in the cortex, a metanephric cap (MC) is first formed around the tips of the two branches of ureteric bud (UB) beneath renal capsule (RC), and then the cell mass becomes a comma-shaped metanephric vesicle (CMV). Then a slit is formed, and the metanephric vesicle is invaded by capillaries (C) through the slit, transforming it into an S-shaped metanephric vesicle (SMV). The epithelium of Bowman's capsule differentiates into two cell layers, visceral epithelium (VE) and parietal epithelium (PE), and then Bowman's space (BS) is formed.

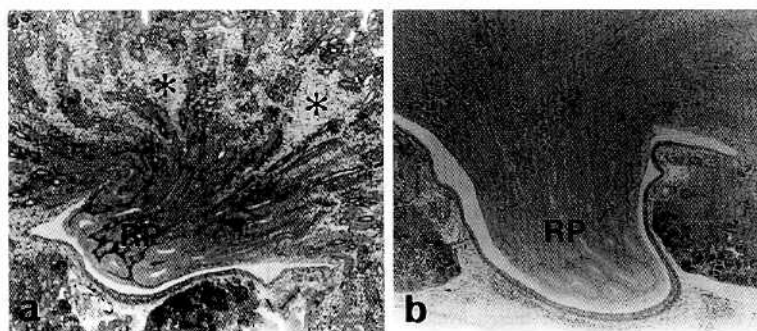


Fig. 4. Renal medulla. Toluidine blue staining,  $\times 30$ . RP: renal papilla.

a. Eighteen days of gestation. Abundant mesenchymal tissue (\*) can be seen among the renal tubules and collecting ducts.

b. Two days after birth. A renal papilla (RP) projects into the pelvis, and mesenchymal tissue disappears from the renal medulla.

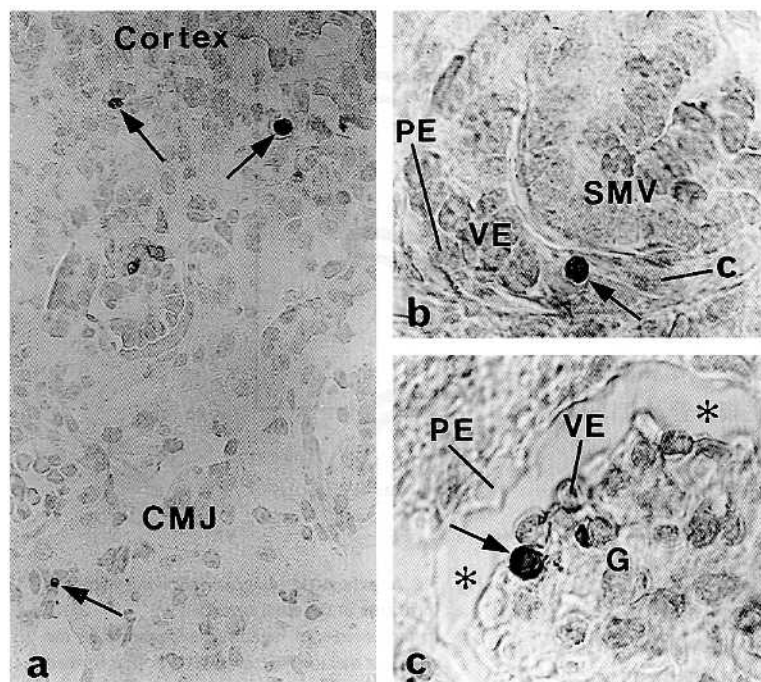


Fig. 5. Light micrographs of the renal cortex stained by TUNEL. Two days after birth.  
 a. A low-powered micrograph. TUNEL positive cells (arrows) are scattered throughout cortex and medulla.  $\times 50$ . CMJ: corticomedullary junction  
 b. An S-shaped metanephric vesicle (SMV). A TUNEL positive cell (arrow) is seen in the visceral epithelium (VE).  $\times 1000$ . c: capillary, PE: parietal epithelium.  
 c. An Immature renal corpuscle. A TUNEL positive cell (arrow) is seen at the periphery of the glomerulus (G) close to Bowman's space (\*).  $\times 1000$ . PE: parietal epithelium, VE: visceral epithelium.

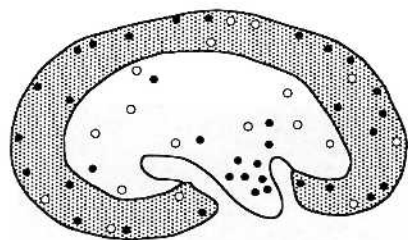


Fig. 6. A diagram showing distribution of cell death in the kidney at two days after birth. The dotted area represents the renal cortex. The solid circles indicate cell death in developing nephrons, and the open circles show cell death in the mesenchyme. Numerous dying cells appear, in particular, in the outer cortex and renal papilla.

## 2. プログラム細胞死と死細胞の分布

ネフロンと集合管の形成が著しい胎生18日から生後2日において、皮質と髄質には実質・間質のいずれにも多数の細胞分裂像が認められる。それと同時に細胞核が濃縮、断片化して死に至る細胞も、皮質と髄質のネフロン形成細胞群や間質結合組織部に多数出現する (Fig. 2d)。生後2日の腎臓切片を TUNEL 法で染色すると、褐色に陽性を呈する細胞は核の濃縮を起こした細胞の分布と一致して腎臓内に広く分布していることが確認できる (Fig. 5a)。

生後2日の腎臓における死細胞の分布例を Figure 6 に示す。この図に示すように死細胞は皮

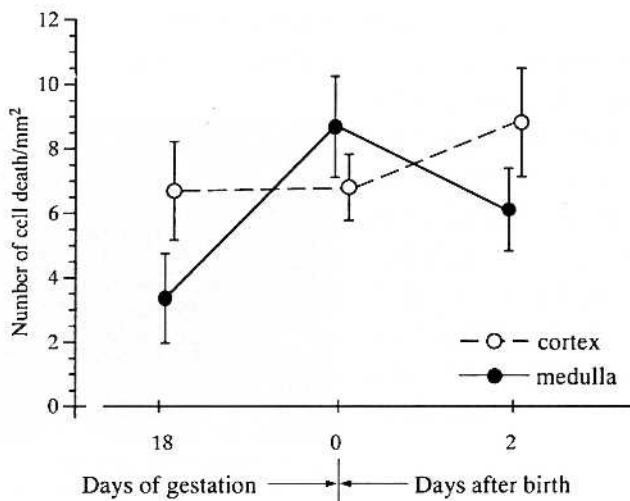


Fig. 7. The number of cell death per renal unit area from 18 days gestation to 2 days after birth. The values represent mean  $\pm$  SD.

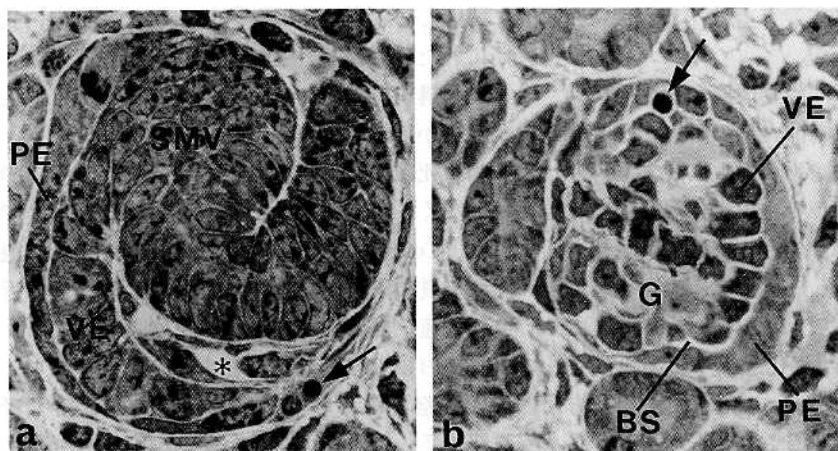


Fig. 8. Cell death in developing nephrons. Two days after birth. Toluidine blue staining,  $\times 1000$ .

PE:parietal epithelium, VE:visceral epithelium.

a. An S-shaped metanephric vesicle (SMV). The arrow indicates a cell with a strongly pyknotic nucleus in a future Bowman's capsule near a capillary (\*) within the SMV.

b. An immature renal corpuscle. A nuclear residue (arrow) can be seen probably within a Bowman's space (BS). G:glomerulus.

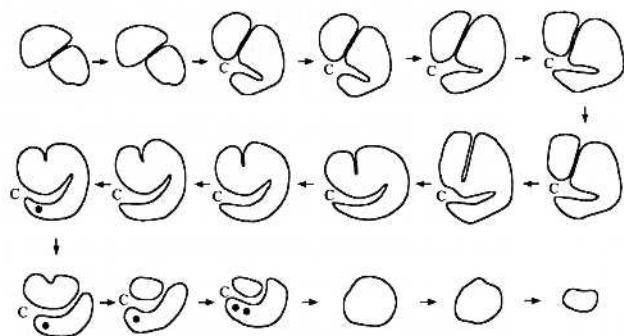


Fig. 9. Eighteen serial sections of an S-shaped metanephric vesicle from the renal cortex. Two days after birth.

Black points, indicating cell death, are present only in the future Bowman's capsule, next to capillary (C) invasion.

質・髄質の両方にみられるが、皮質ではとくに被膜の近くに、髄質では乳頭部に多く、皮髄境界領域には少ないのが特徴である。胎生18日、生後0日及び生後2日における単位 ( $/\text{mm}^2$ ) 面積あたりの死細胞数を算出すると、腎全体では胎生18日で5.5個/ $\text{mm}^2$ 、生後0日で7.6個/ $\text{mm}^2$ 、生後2日で7.6個/ $\text{mm}^2$ で、出生後やや増加する傾向がある。皮質では胎生18日から生後2日の間で単位面積あたり6.6~8.7個の死細胞が含まれる (Fig. 7)。各期とも皮質における細胞死のうち35%は間質中に出現する。髄質に

おける死細胞数は胎生18日で  $3.2 \pm 1.5/\text{mm}^2$  で皮質に比べて有意に少ない ( $P < 0.01$ ) が、胎生18日から生後0日の間で約3倍に増加し ( $P < 0.01$ )、その数において皮質との差はなくなる。髄質における細胞死は生後0日で最も多く、特に乳頭先端部付近に多い。髄質の細胞死の43%は間質に出現す

る。生後の髄質の細胞死はネフロン・集合管の実質細胞と間質結合組織細胞の両方で増加する。

### 3. 皮質におけるネフロンの発達と細胞死の局在

皮質内でネフロンとなる腎胞細胞集団中に生ずる細胞死は、造腎帽子、カンマ型腎胞およびS字型腎胞に至るネフロンの形成過程の中で、とくに毛細血管が侵入するS字型腎胞で多く見られる (Fig. 8a)。細胞死はネフロン先端部すなわち将来の腎小体となる部位に多い傾向がある。

S字型腎胞全体を連続切片で観察すると (Fig. 9)、腎胞の輪郭は直径が約  $50 \mu\text{m}$  の球形を呈し、細胞死は尿細管形成部ではなく毛細血管侵入部より腎胞先端の糸球体包前駆細胞群中に認められ、この部位の死細胞はTUNEL法でも陽性を呈する (Fig. 5b)。なお、細胞死はS字型腎胞のみならず、皮質深層で皮髄境界領域近くにある完成しつつある腎小体内にもわずかであるが出現する (Fig. 8b, 5c)。

## 考 察

成績に述べたように、胎生後期から生後早期のマウス腎臓には、核濃縮・核の断片化など核の形態異常を伴った細胞死が多数出現する。今日、細胞死は細胞質なかでも細胞小器官の変化が主体となるネクロシスと、核の形態変化を初発の兆候とするアポトーシスとに大別されている<sup>3), 8)</sup>。TUNEL法はアポトーシスによって核内で生じたDNAの断片化を標本上で可視化する方法で<sup>7), 9)</sup>、アポトーシスの検出法の一方法として確立され、今日広く用いられるようになった。生後2日の腎臓切片をTUNEL法で処理すると、陽性を呈する細胞が多数認められ、核の形態的变化とTUNEL法の結果から、この時期の腎臓における細胞死の多くはアポトーシスの特徴を持つプログラム細胞死とみなすことができる。

マウスにおいて胎生12日から後腎の原基が形成され始め、胎生17、18日で最も早期のネフロンの分化が完成し、尿の産生を始めると言われる<sup>10)</sup>。胎生13日の後腎発生の初期に、腎臓の間葉細胞がネフロン前駆細胞へと分化する際、間葉細胞の一部がアポトーシスに陥るといわれ<sup>4), 11)</sup>、間葉細胞が細胞死に至ることなくネフロン細胞へと分化する為の誘導物質が尿管芽細胞から産生されるという<sup>6)</sup>。生後の腎臓の発達過程でも間質には多数の細胞死が出現する一方、後腎胞実質細胞に細胞死は少ないとも報告されている<sup>12)</sup>。成績で述べたように、胎生18日の腎臓皮質とくにその深層にすでに完成された糸球体・ネフロンが皮髄境界領域に沿って層状に分布する状態を観察することができ、皮質中央部から被膜側には、生後も次々とネフロンが新生される。胎生12、3日の腎臓発生初期だけでなく、生後早期においても腎皮質で分化・発達するネフロン形成細胞群中に細胞死が多数発生することが本研究で明らかとなった。胎生18日から生後2日の腎臓内の細胞死のうち約65%はネフロン形成細胞で残りの35%は間質に分布することを考えあわせると、アポトーシスは腎発生

に関連して初期発生時から生後まで腎臓内に長期にわたって生じ、生後も後腎胞細胞群からネフロン構成細胞への分化に深く関与する可能性が明らかである。

細胞死は皮髄両質において均一に分布するのではなく、各々局所的に集合する傾向が顕著である。Colesら<sup>13)</sup>はラットの生後の腎臓で細胞死が皮質のネフロン形成層と髄質の乳頭部の近位部と遠位部とに集合する事を報告している。皮質において細胞死が局在するのは、ネフロン形成細胞群におけるアポトーシスがS字型腎胞期で多いこと、さらに、間葉細胞から腎胞への分化が被膜直下で行われることの2点に起因すると考えるのが妥当であろう。皮質における実質細胞の死は、毛細血管が腎胞内へと進入するS字型腎胞期以後に糸球体包原基内に出現すること、さらに少数ではあるが完成途上の未熟な腎小体にも出現することから、糸球体包ならびに毛細血管・糸球体の分化・発達と関連している可能性が高く、今後の詳細な検討が必要である。皮質と異なり生後急速に増加する髄質における細胞死は、生後の髄質間質の減少がその結果としてもたらされると考えられるが、髄質にも多数の非間質性細胞死が認められることから、この時期のヘンレループや集合管系の分化・発達との関連も考慮する必要がある。TUNEL法ではネクロシスに陥った細胞も一部陽性に反応するといわれ<sup>14)</sup>、アポトーシスによる細胞死の確証には電顕レベルでの形態学的な観察も必要とされる。アポトーシス細胞の処理に関連する細胞の解析もふくめて、プログラム細胞死の視点に立ち、皮髄両質におけるネフロンの分化・発達についての電顕レベルでの詳細な検討が緊急の課題である。

稿を終えるにあたり、終始懇切な御指導をいただいた佐々木教授に深甚なる謝意を表すとともに、実験について御協力いただいた解剖学教室員の方々、組織・電子顕微鏡センターの方々に感謝する。なお、本研究の一部は日本私学振興財団私立大学等経常費補助金特別補助(大学院重点特別経費・学生分、1997年度)の助成を受け行われた。



## 文 献

- 1) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR : Apoptosis : A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 : 239 - 257, 1972
- 2) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR : Cell death : The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251 - 306, 1980
- 3) Majno G, Joris I : Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146 : 3 - 15, 1995
- 4) Koseki C, Herzlinger D, Al-Awqati Q : Apoptosis in metanephric development. *J Cell Biol* 119 : 1327 - 1333, 1992
- 5) Columbano A : Cell death : Current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem* 58 : 181 - 190, 1995
- 6) Barasch J, Pressler L, Connor J, Malik A : A ureteric bud cell line induces nephrogenesis in two steps by two distinct signals. *Am J Physiol* 271 : F50 - F61, 1996
- 7) Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E : In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method : Improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 44 : 959 - 968, 1996
- 8) Uchiyama Y : Apoptosis : The history and trends of its studies. *Arch Histol Cytol* 58 : 127 - 137, 1995
- 9) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493 - 501, 1992
- 10) Rugh R : *The Mouse*. 2nd ed., New York, Oxford University Press. 1990, pp 276 - 281
- 11) Koseki C : Cell death programmed in uninduced metanephric mesenchymal cells. *Pediatric Nephrol* 7 : 609 - 611, 1993
- 12) Garcia-Porrero JA, Ojeda JL, Hurler JM : Cell death during the postnatal morphogenesis of the normal rabbit kidney and in experimental renal polycystosis. *J Anat* 126 : 303 - 318, 1978
- 13) Coles HSR, Burne JF, Raff MC : Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development* 118 : 777 - 784, 1993
- 14) Yasuda M, Umemura S, Osamura Y, Kenjo T, Tsutsumi Y : Apoptosis cells in the human endometrium and placental villi : Pitfalls in applying the TUNEL method. *Arch Histol Cytol* 58 : 185 - 190, 1995